



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

203711  
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 13 02 79  
(21) (PV 969-79)

(40) Zveřejněno 30 06 80

(45) Vydáno 15 05 83

{51} Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 07 J 1/00 //  
A 61 K 49/02

(75)  
Autor vynálezu

KOZÁK IVAN ing. CSc., DVOŘÁK PAVEL ing.  
a HAMPL RICHARD RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob výroby 17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-onu, 17 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-onu a 17 $\beta$ -hydroxy-4-estren-3-onu značených radioizotopy jodu

1

Vynález se týká způsobu výroby radioaktivních jododerivátů 17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-onu (testosteronu), 17 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-onu (methyltestosteronu) a 17 $\beta$ -hydroxy-4-estren-3-onu (nortestosteronu) s atomem jodu vázaným přímo na steroidní skelet.

Steroidní sloučeniny, obsahující radioaktivní atom buď sloučenině vlastní jako <sup>3</sup>H, nebo jiný vhodný isotop jiného prvku (nejčastěji <sup>125</sup>I) vázaný přes konjugát steroidu s histaminem nebo tyraminem se jako radioanalyzy (RIA) steroidů. Jiné metody stanovení hladin steroidů v biologických tekutinách jsou pro jejich nízké koncentrace technicky velmi obtížné. Tritiované steroidy jsou vhodné pro RIA svou imunoreaktivitou a stabilitou, hlavním jejich nedostatkem je obtížná detekce měkkého  $\beta$  záření tritia, vyžadující složité, drahé a v ZST nevyráběné scintilační spektrometry.

Oproti tomu detekce  $\gamma$  izotopy značených steroidů je podstatně jednodušší a levnější. Jododeriváty steroidů, značené <sup>125</sup>I se používají pro RIA stanovení zatím méně často. Atom jodu je v těchto sloučeninách vázán na histaminový nebo tyraminový zbytek, který je připojen ke steroidní molekule. U těchto konjugátů může docházet ze

2

sterických důvodů ke snížení imunoreaktivitu oproti původnímu steroidu a rovněž ke zvýšení nespecifické vazby. Syntéza těchto látek je dosti obtížná a vyžaduje komplikovaný separační postup. Stabilita jodovaných konjugátů je nižší než u tritiových sloučenin jak v pevném stavu, tak i v roztoku; zvláště pak jsou nestabilní při podání in vivo do organismu. Tato nestabilita může být zvláště nevýhodná v budoucnu, protože v nukleární medicíně se uvažuje o možnostech pozitivní scintigrafie hormonálně dependentních orgánů pomocí specifických radiofarmak značených  $\gamma$  izotopy.

Nedávno byly připraveny jododeriváty některých steroidů, v nichž je atom jodu vázán přímo na steroidní skelet. Této vazby je dosahováno krátkodobým zahřátím směsi steroidu s radioaktivním jodidem sodným na teplotu 173 až 179 °C (Thakur M. L., Vaters S. L.: Evaluation of a method for the preparation of high specific activity radioiodinated oestradiol, Int. J. Appl. Radiat. Isotopes 27:585—588, 1976). Autoři však neprovedli podrobnější studium reakčních produktů ani jejich vlastností, včetně možnosti využití pro RIA. V pracích Hampl R., Dvořák P., Lukešová Š., Kozák I., Chrpová M., Stárka L.: The use of iodina-

ted steroid as radioligand for testosterone radioimmunoassay, (J. Steroid. Biochem. 9: 771–773, 1978) a Dvořák P., Hampl R., Lukešová Š., Kozák I., Chrpová M., Stárka L.: Radioimmunoassay of testosterone-comparison of  $^3\text{H}$  and  $^{125}\text{I}$  labeling (Radiochem. Radioanal. Letters 34: 295–300, 1978) autoři tohoto vynálezu srovnali možnost použití  $^{125}\text{I}$  a  $^3\text{H}$  radioligandů k RIA testosteronu.

Většina uvedených nedostatků je odstraněna způsobem výroby  $17\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-onu,  $17\alpha$ -methyl- $17\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-onu a  $17\beta$ -hydroxy-4-estren-3-onu ze skupiny  $\Delta^4$ -3-oxo- $\text{C}_{19}$ -steroidů, značených na skeletu radiojodem podle vynálezu, jehož podstatou je úprava beznosičového radioaktivního jodidu sodného tím, že se jeho komerčně dodávaný roztok odpaří do sucha a odparek se extrahuje polárním organickým rozpouštědlem (aceton, methanol, methylethylether). Tím dojde k oddělení příměsí, obsažených jako stabilizátory v roztoku radiojodidu a ztěžujících provedení reakce. Extrakt se přidá ke steroidu určenému ke značení, přičemž molární poměr steroidu k jodidu sodnému činí 100 : 1 až 1 000 000 : 1 a výsledný roztok se odpaří do sucha. Odparek se pak zahřívá v lázni při teplotě ležící mezi teplotou tání příslušného steroidu až 190 °C po dobu 0,5 až 5 minut.

Reakční směs se opakovaně chromatografuje na tenké vrstvě silikagelu s UV 254 absorpčním indikátorem (Silufol UV<sub>254</sub>), umožňujícím pozorovat  $\Delta^4$ -3-oxo- $\text{C}_{19}$ -steroidy v UV světle. Vhodnými soustavami pro chromatografii jsou cyklohexan-ethylacetát 1 : 1 a benzen-methanol 9 : 1, v nichž relativní  $R_f$  jodovaného imunoreaktivního produktu vzhledem k výchozímu  $\Delta^4$ -3-oxo- $\text{C}_{19}$ -steroidu činí 0,60 až 0,85. Tento radioaktivní produkt se po eluci použije jako radioligand pro RIA toho steroidu, který byl použit ke značení.

Použitím extrakcí upraveného radioaktivního jodidu sodného je dosahováno 2 až 5krát vyšších výtěžků než s neupraveným jodidem a je možné použít radioaktivní jodid sodný různé specifické aktivity a od různých výrobců. Syntéza jododerivátů steroidů je jednodušší než syntéza konjugátů a rovněž i jejich separace je z důvodů jejich vysoké chemické stability jednodušší než u histaminyl- a tyraminyl-derivátů. Stabilita roztoků steroidů jodovaných přímo na jádře je vyšší než u konjugátů, neboť nedochází k hydrolýze konjugovaných skupin ve vodných roztocích. Výhody jednodušší detekce  $\gamma$  zůstávají rovněž zachovány.

### Příklady provedení

#### Příklad 1

Úpravy radioaktivního jodidu sodného

a) Ke komerčně dodávanému  $\text{Na}^{125}\text{I}$  v 0,1 N NaOH o celkové aktivitě 37 MBq se přidá 0,2 ml nasyceného vodného roztoku hydrogenufosforečnanu draselného a směs se odpaří proudem dusíku při teplotě 90 °C. Zbytky vody se odstraní dvojnásobným odpařením s 2 ml směsí methanol-benzen 1 : 1. Radioaktivní jodid sodný se extrahuje 2 minutovým třepáním s 2 ml acetonu. Acetonový extrakt jodidu se použije pro syntézu.

b) Komerčně dodávaný roztok  $\text{Na}^{125}\text{I}$  ve fyziologickém roztoku o celkové aktivitě 185 MBq se při teplotě 60 až 80 °C odpaří za sníženého tlaku dosucha. Radioaktivní jodid sodný se extrahuje 2 ml methanolu za třepání po dobu 2 minut. Metanolový extrakt jodidu se použije pro syntézu.

#### Příklad 2

Syntézy a vyisolování imunoreaktivních jodovaných značených steroidů

a) K extraktu upraveného radioaktivního jodidu sodného (viz. příklad 1 a) nebo 1 b) se přidá 0,2 ml (1 mg) acetonového roztoku testosteronu a po promíchání se rozpouštědlo odpaří v proudě dusíku. Zkumavka s odparkem se zahřeje na olejové lázni po dobu 90 s při teplotě 172 až 175 °C. Po ochlazení se tavenina rozpustí v 0,2 ml acetonu a chromatografuje na Silufolu UV 254 v soustavě benzen-methanol 9 : 1. Po vyhodnocení rozdělení radioaktivity se vyeluuje acetonem (5 ml) frakce o  $R_f = 0,24$  až 0,38 ( $R_f$  testosteronu = 0,40 až 0,50). Kontrola čistoty vzniklého jododerivátu se provede radioimunologickým srovnáním s  $^3\text{H}$  testosteronem o specifické aktivitě 740 GBq/mmol. V případě, že produkt vyhovuje pro RIA méně než tritiovaný steroid, chromatografie se opakuje. Takto připravený produkt se použije jako radioligand k RIA testosteronu.

b) K extraktu upraveného radioaktivního jodidu sodného (viz. příklad 1 a) nebo 1 b) se přidá 0,1 ml (0,1 mg) acetonového roztoku methyltestosteronu a po promíchání se rozpouštědlo odpaří v proudě dusíku. Zkumavka s odparkem se zahřeje na olejové lázni po dobu 60 s při teplotě 180 až 182 °C. Po ochlazení se tavenina rozpustí v 0,2 ml acetonu a chromatografuje na Silufolu UV 254 v soustavě benzen-methanol-aceton 9 : 1 : 1. Po vyhodnocení rozdělení radioaktivity se vyeluuje acetonem (5 ml) frakce s  $R_f = 0,23$  až 0,35 ( $R_f$  methyltestosteronu = 0,51 až 0,60). Kontrola čistoty se provede srovnáním s  $^3\text{H}$  methyltestosteronem obdobně jako v příkladu 2 a).

c) K extraktu upraveného radioaktivního jodidu sodného (viz. příklad 1 a) nebo 1 b) se přidá 0,1 ml (0,2 mg) acetonového roztoku nortestosteronu a po promíchání a odpaření rozpouštědla se zkumavka zahře-

je na olejové lázni po dobu 180 s při teplotě 175 až 180 °C. Tavenina se rozpustí v 0,2 ml acetonu a chromatografuje na Silufolu UV 254 v soustavě cyklohexan-ethylacetát 1:1. Po vyhodnocení rozdělení radioaktivity se vyluuje acetonem (5 ml) frakce s  $R_f = 0,18$  až  $0,33$  ( $R_f$  nortestosteronu =  $0,38$  až  $0,50$ ). Kontrola čistoty se provede srovnáním s  $^3\text{H}$  nortestosteronem obdobně jako v příkladu 1 b).

Radioaktivní jododeriváty  $\Delta^4$ -3-oxo- $\text{C}_{19}$ -steroidních hormonů a syntetických steroidních léčiv je možné využít pro RIA těchto látek v humání i veterinární medicíně, zemědělství a pro účely dopingové kontroly. Využití těchto látek lze očekávat v receptorové analýze in vitro a pro pozitivní scintigrafii hormonálně dependentních orgánů in vivo v nukleární medicíně.

#### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby  $17\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-onu,  $17\alpha$ -methyl- $17\beta$ -hydroxy-4-androsten-3-onu a  $17\beta$ -hydroxy-4-estren-3-onu značených radioizotopy jodu, vyznačující se tím, že se vodný roztok beznosičového radioaktivního jodidu sodného odpaří dosucha, odparek se extrahuje polárním organickým rozpouštědlem a výsledný extrakt se přidá k výše uvedenému steroidu určenému ke značení, přičemž molární poměr steroidu k jodidu sodnému činí 100:1 až 1 000 000:1, získaný roztok se odpaří dosucha a odparek se zahřívá při teplotě v rozmezí teploty tání příslušného steroidu až 190 °C, načež se reakční směs chroma-

tografuje pro oddělení žádoucího imunoaktivního radioaktivního produktu od příměsí.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že pro extrakci beznosičového radioaktivního jodidu sodného se jako polárního rozpouštědla používá methylethylketonu, methanolu, acetonu a diethyletheru.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že pro oddělení žádoucího radioaktivního produktu od příměsí se používá opakovaná chromatografie na tenké vrstvě silikagelu v soustavách cyklohexan-ethylacetát 1:1 a benzen-methanol 9:1.